

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA
MAESTRIA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Fusarium*
Oxysporum Schl. f. sp. *ciceri* (Padw) Matuo & Sato.
POR RAPDs //

TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTA OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

AUGUSTO CÁMARA MOTA



B.1695169

CHAPINGO, MEXICO, FEBRERO DEL 2001



**DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *F. oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri*
(Padwick) Matuo & Sato. POR RAPDs**

Tesis realizada por **AUGUSTO CÁMARA MOTA**, bajo la dirección del Dr. Nahúm Marbán Mendoza y Asesorada por Dra. Ernestina Valadez Moctezuma y Dr. Roney Solano Vidal y aprobada por el comité asesor y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

COMITÉ ASESOR

Director:



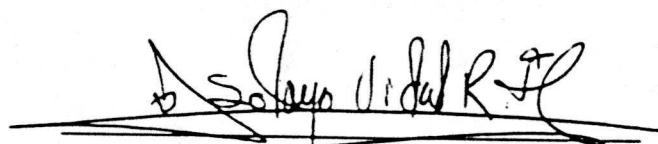
DR. NAHÚM MARBÁN MENDOZA

Asesor:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

Asesor:



DR. RONEY SOLANO VIDAL

Asesor



M.C. JOSÉ MANUEL ARCEO ARCEO

A-37946

Asesor



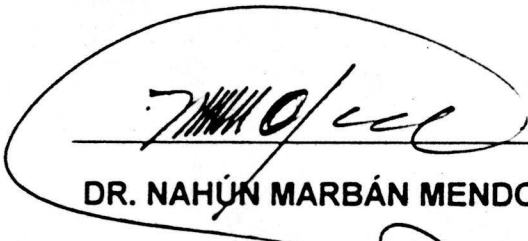
DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCON

DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *F. oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri*
(Padwick) Matuo & Sato. POR RAPDs

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Augusto Cámara Mota**, autor de la presente tesis de **Maestría en Ciencias en Protección Vegetal**, estuvo constituido por:

COMITÉ ASESOR

Presidente:



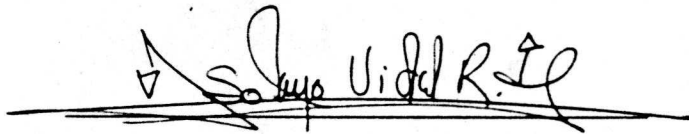
DR. NAHÚN MARBÁN MENDOZA

Asesor:



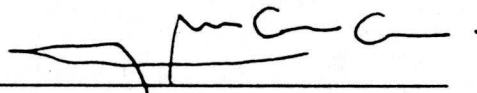
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

Asesor:



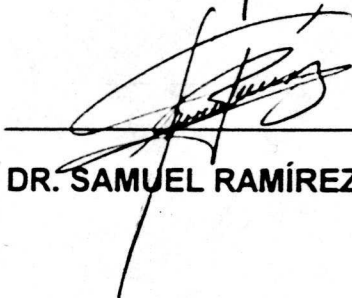
DR. RONEY SOLANO VIDAL

Asesor



M.C. JOSÉ MANUEL ARCEO ARCEO

asesor



DR. SAMUEL RAMÍREZ ALARCON

DEDICATORIA

Con cariño, respeto y admiración a mis padres.

Alfonso Cámara Baak y Teresa de Jesús Mota Ávila

Quienes por su amor, ejemplo y tenaz lucha por ofrecerme lo mejor que en esta vida se puede dar, motivándome siempre a superarme. ¡Gracia Mil!

A mi Abuela Onecifora⁽⁺⁾, a mis tías Soledad ⁽⁺⁾ y Cristina, por su amor y cariño.

A mis hermanos, Silvia, Alfonso, Enrique, Ligia, Elizabeth y Edaly, Por los momentos vividos y por su apoyo, cariño y confianza.

A mis sobrinos, Carely, Mercy y Antonio con cariño.

A Melba por su amor, por estar siempre en los momentos difíciles, con amor y agradecimiento.

A Karina, por su cariño, amistad y por motivarme a finalizar este proyecto, con cariño.

A mis amigos Ramona Pérez Leal, Javier Mijangos Cortez, Andrés Quijano y Roney solano Vidal, por su amistad y confianza.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Nahún Marbán Mendoza, Dra. Ernestina Valadéz Moctezuma, Dr. Roney Solano Vidal, M. C. José Manuel Arceo Arceo y Dr. Samuel Ramírez Alarcón por su acertada dirección y revisión de este trabajo, así por la confianza que tuvieron en mí.

Al Dr. Felipe Delgadillo, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

A la M. C. María Elisa Alvarado y Ricardo Gaspar del laboratorio de Biología Molecular, por su apoyo en la realización de este trabajo y por su amistad brindada.

A Aurora Huerta Ortiz, por la confianza y amistad.

A Felipe Martínez, por su amistad y apoyo incondicional.

Al Sr. Miguel Díaz Baltasar, por su amistad y por todo el apoyo brindado.

A mis amigos Arceo López Borges, Manuel Deras Perla, Rodolfo Gaona Ramírez y Víctor Tello Mercado, por su amistad y confianza durante mi estancia en la Universidad.

DATOS BIOGRÁFICOS

Augusto Cámara Mota nació en Ticul, Yucatán, México el 13 de Abril de 1966. Realizó sus estudios básicos en Ticul y Mérida, Yucatán; sus estudios universitarios los realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo, Coahuila donde obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo en 1991.

Su experiencia laboral es como Investigador Auxiliar en el Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados de 1991 a 1995, Técnico en el Área de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán de 1996 a 1997, Coordinador en el Programa Elemental de Asistencia Técnica en el Estado de Yucatán de 1996 a 1997.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. El cultivo de garbanzo	4
2.1.1. Importancia	4
2.1.2. Fitosanidad	5
2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	6
2.2.1. Distribución e importancia	6
2.2.2. Antecedentes	7
2.2.3 Síntomas	8
2.2.4. Descripción	9
2.2.5. Variabilidad	10
2.3. Técnicas de caracterización e identificación de la variabilidad de aislamientos	10
2.3.1. Plantas diferenciales	11
2.3.2. Grupos de compatibilidad vegetativa	12
2.3.3. Marcadores genéticos	13
2.3.4. Marcadores morfológicos	14

2.3.5. Marcadores moleculares	14
2.3.5.1. Marcadores proteínicos	15
2.3.5.2. Marcadores basados en ADN	17
2.3.5.2.1. Hibridación de ácidos nucleicos	18
2.3.5.2.2. PCR	20
2.3.5.2.3. AFLP	22
3. MATERIALES Y METODOS	25
3.1. Organismo y condiciones de cultivo	25
3.2. Obtención de micelio	25
3.3. Extracción de ADN	26
3.4. Cuantificación y pureza de ADN	27
3.5. Selección de iniciadores	28
3.6. Condiciones de amplificación por RAPD	28
3.7. Separación de los fragmentos amplificados	29
3.8. Análisis estadístico	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Extracción de ADN	31
4.2. Estandarización de la reacción	31
4.3. Selección de iniciadores	32
4.4. Separación de los productos amplificados	32
4.5. Interpretación del dendograma	42
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. iniciadores de la casa comercial Carl Roth GMBH probados para la selección y utilización en RAPD.	29
Cuadro 2. Resultados de las cantidades óptimas para la amplificación por RAPD.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Calidad de ADN obtenido de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>ciceri</i> colectados en los diferentes municipios.	31
Figura 2. Fragmentos amplificados por RAPD del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> ; con el iniciador ROTH C-05.	34
Figura 3. Fragmentos amplificados por RAPD del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> ; con el iniciador ROTH C-08.	35
Figura 4. Fragmentos amplificados por RAPD del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> ; con el iniciador ROTH C-09.	36
Figura 5. Fragmentos amplificados por RAPD del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> ; con el iniciador ROTH C-14.	37
Figura 6. Fragmentos amplificados por RAPD del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> ; con el iniciador ROTH C-16.	39
Figura 7. Fragmentos amplificados por RAPD del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> ; con el iniciador ROTH C-18.	40
Figura 8. Fragmentos amplificados por RAPD del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> ; con el iniciador ROTH C-19.	41
Figura 9. Dendograma generado del análisis de los fragmentos amplificados por RAPD de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i> por el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de Jaccard.	45

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue diferenciar genéticamente cepas de *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceri* colectadas en siete municipios de Guanajuato, México. El ADN de 75 aislamientos monosporicos (25 cepas) fueron amplificados por la técnica de PCR utilizando iniciadores aleatorios (RAPDs). Los productos amplificados fueron observados por electroforesis en geles de agarosa y analizados por el programa NTSYSpc 2.3 utilizando el método de agrupamiento UPGMA con el coeficiente de Jaccard. El análisis de similaridad de las bandas amplificadas permitió observar variación genética bastante amplia que no permitió definir grupos que indicaran alguna correlación con las razas reportadas, se encontraron distintos agrupamientos con 35 % de similaridad se formaron cuatro grupos, a 50 % de similaridad 11 grupos y a 75 % 34 de similaridad grupos.

Palabras clave: *Fusarium oxysporun*, ADN, PCR, Coeficiente de similaridad genética

SUMMARY

This work was conducted to genetically differentiate strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri, collected in 11 municipalities of the state of Guanajuato, Mexico. The DNA of 75 monosporic isolates out of 25 strains of the fungus, were amplified using PCR technics and using random primers (RAPDs). The amplified products were observed using electrophoresis on agarose gels and analyzed with the program NTSYSpc2.3 and the grouping method UPGMA with the Jaccard coefficient. Similarity analysis of the amplified bands showed a wide genetic variation which did not allow to define groups with any correlation with the reported strains. Were found 4, 11, and 34 groups with 35, 50, and 75% of similarity, respectively.

Key words: *Fusarium oxysporum*, ADN, PCR, Genetic coefficient Similar

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades son un factor limitante en la producción del garbanzo (*Cicer arietinum* L.), se conocen más de 50 patógenos asociados a este cultivo provocando distintas etiologías en diferentes áreas del mundo, y en ocasiones con efectos devastadores (Nene y Haware, 1980; Reddy *et al.*, 1989, citado por Jiménez, 1994). En México la más importante por su distribución y severidad es la “rabia” ocasionada por un complejo de hongos entre los que se encuentra *F. oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *ciceri* (Padwick) Matuo & K. Sato. Este patógeno provoca la muerte de plantas en diferentes etapas del desarrollo del cultivo (Mateos, 1996; Díaz 1996).

Las pérdidas provocadas por esta enfermedad varían de una región a otra, desde 10 % hasta 100 %, dependiendo de las condiciones agroclimáticas (Brushan y Harri, 1992; Jiménez, 1994; Díaz *et al.*, 1996).

En regiones productoras de garbanzo se han observado diferentes tipos de reacción en la interacción planta-patógeno, se describen síntomas de marchitez y/o amarillamiento, así como la respuesta diferencial de líneas de garbanzo inoculadas con aislamientos del patógeno, permitiendo registrar la existencia de razas del hongo (Haware y Nene, 1982; Trapero y Jiménez, 1985; Phillips, 1988; Jiménez, 1994).

El hongo presenta variabilidad y ha sido observado por varios investigadores la relación que existe entre la coloración del micelio en aislamientos puros con los síntomas ocasionados, así como los filtrados de compuestos tóxicos producidos por el hongo; lo que permitió separarlos en grupos (Phillips, 1988; Cabrera *et al*, 1985; Brushan y Chand, 1992; Jiménez, 1994).

Los métodos de diagnóstico tradicionales se usan rutinariamente; sin embargo, las técnicas de biología molecular permiten una detección rápida y acertada de patógenos, facilitando los estudios en aquellos cuya detección y distribución serían tediosos y difíciles de cuantificar en campo; permitiendo un diagnóstico altamente específico y una detección eficiente de variantes patogénicas. El diagnóstico oportuno de los patógenos, así como el conocimiento de su variabilidad genética permite desarrollar las bases para nuevos enfoques en medidas de control efectivas y seguras (Flores *et al.*, 1997).

Las técnicas basadas en la información genética para el diagnóstico de organismos, se han incrementado ampliamente en los últimos años. Entre las más utilizadas se encuentra la hibridación de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La reacción en cadena de la polimerasa ha revolucionado el diagnóstico de enfermedades en plantas y es la de mayor uso debido a que no se circunscribe a la detección de patógenos sino que es una herramienta básica para el desarrollo de otras técnicas moleculares. El uso de técnicas como los polimorfismos de la longitud de

fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés), polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) o polimorfismos en la longitud de cromosomas (CLP por sus siglas en inglés), han podido establecer la variabilidad genética de los patógenos. El uso de estas tecnologías se viene utilizando en la diferenciación de patógenos de difícil identificación y abre oportunidades para el desarrollo de métodos de control nuevos, más efectivos y seguros para el ambiente (Flores *et al*, 1997).

Por lo anteriormente descrito, este trabajo tuvo como objetivo identificar la variabilidad genómica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* mediante huellas genómicas detectadas por RAPDs.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo de garbanzo

2.1.1 Importancia

El garbanzo (*C. arietinum* L.), es la tercera leguminosa de grano cultivada en el mundo, su importancia deriva en su aprovechamiento en la dieta de muchos países ya que tiene alto valor nutritivo (19.7, 60.75 y 6 % de proteína, carbohidratos y grasa respectivamente, así como minerales, calcio y hierro). Su proteína es considerada de mayor valor biológico entre las leguminosas de consumo humano (Govantes y Montañez, 1982; De Miguel, 1991; Mateos, 1996; Haware, 1998). Es considerado un cultivo dentro de los patrones agrícolas de bajo requerimiento hídrico cultivándose en regiones de baja precipitación (Govantes y Montañez, 1982).

El garbanzo se cultiva en varios países de Asia, África, Europa y América con una superficie mundial de 12.03 millones de hectáreas y una producción de 7.6 millones de toneladas (Jalali y Chahd, 1992; Haware, 1998; FAO, 2000).

En México se cultiva el garbanzo tipo Kabuli y Desi. En la región del Bajío en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán y Jalisco, se produce el garbanzo café tipo Desi denominado localmente como “porquero o forrajero” que se destina principalmente para la alimentación de cerdos (90 %

de la producción). En la región del Noroeste en los estados de Sonora, Baja California Sur y Sinaloa se cultiva el garbanzo blanco tipo Kabuli destinado para la exportación para el consumo humano. En las últimas décadas se ha extendido el cultivo de esta leguminosa a los estados de Tamaulipas y Nuevo León (Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 1996). De acuerdo con la FAO (2000) en nuestro país se cultiva una superficie de 211 295 ha con una producción promedio de 1t.ha⁻¹.

2.1.2 Fitosanidad

Uno de los factores limitantes en la producción de esta leguminosa son las enfermedades; se conocen 67 hongos, 3 bacterias, 22 virus y 80 nemátodos asociados a este cultivo (Nene *et al.*, 1996; citado por Hawaer, 1998). Entre las enfermedades que atacan al garbanzo en México, se encuentra “la rabia”, nombre genérico que se ha dado al complejo de fitopatógenos del suelo que atacan a la raíz y tallo, que ocasionan marchites o secadera y muerte de plantas durante el desarrollo del cultivo (FAO, 1984; Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998). La rabia es considerada como el principal factor limitante para la producción de garbanzo y se encuentra distribuido en todas las zonas productoras de este cultivo en nuestro país (FAO, 1984; Gómez *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 1996; Mateos, 1996).

Los hongos asociados a este complejo son *Fusarium solani* (Mart. Apple End Wr), *F. oxysporum* Schlechtend Emend. Snyder & Hans. f. sp *ciceri*

(Padwick). Snyder & Hans, *Rhizoctonia solani* Kuehn, *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Asheley y *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 1996; Mateos, 1996).

De este complejo el género *Fusarium* es considerado el más importante por su distribución y patogenicidad, ya que causa la muerte de plantas en todo el ciclo vegetativo del garbanzo (Gómez y Paredes, 1984; Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998).

2.2 *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceri*

2.2.1 Distribución e importancia

La marchitez por *F. oxysporum* f sp. *ciceri* es una de las enfermedades más importantes del garbanzo; se encuentra distribuida en los países donde se cultiva esta leguminosa como son India, Turquía, Persia, Afganistán, Austria, Suiza, Egipto, Grecia, Roma, Francia, Marruecos, Túnez, Bangladesh, Etiopía, Pakistán, Siria, Tunesia, Chile, Irán, Sudán, Estados Unidos, Perú, URSS, Malawi, Nepal, España y México entre otros (Jalali y Chand 1992, Jiménez, 1994).

FAO (1984), reporta que en México esta enfermedad se encuentra distribuida en los estados de Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Jalisco, Sonora, Baja California Sur, Sinaloa, Tamaulipas y Nuevo Leon.

Esta enfermedad provoca pérdidas que van de 10 % a 15 % anual, pero en años en que la epidemia es severa puede ocasionar pérdidas del 60 % al 70 % (Jalali y Chand; 1992). Nema y Khare, 1973 (citados por Jalali y Chand 1992), mencionan que observaron daños en plántulas y en etapa de floración de un 61 % y 43% respectivamente y una disminución en el número de semillas por planta. En la India se reportan pérdidas de un 10% en la producción; en España las pérdidas son de un 12-15%. En California (USA), la producción disminuyó en los últimos años debido a la marchitez; en Túnez se reportan pérdidas del 40%. El International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) estima pérdidas ocasionadas por esta enfermedad de un 24% a 65 % (Haware y Nene, 1980; citado por Haware, 1998; Singh y Dahiya, 1973; Trapero y Jiménez, 1985; Jalali y Chand 1992).

2.2.2 Antecedentes

De acuerdo con Haware (1998) el primer reporte del marchitamiento del garbanzo ocasionado por *F. oxysporum* f sp. *ciceri* fue en la India por Butler (1918). McKerral (1923) consideró que la enfermedad se encontraba en el suelo. Narsimhan (1929) y Dastur (1935) reportaron que *Fusarium* spp. se encontraba asociado con *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, ocasionando

el marchitamiento de las plantas. Dastur (1935) no pudo probar la patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* sp. y concluyó que la marchitez era ocasionada por factores abióticos. En 1939 Prasad y Padwik reportaron a *Fusarium* sp. como agente causal de la marchitez del garbanzo. Padwik (1940) llamó a este hongo *F. orthoceras* Appel & Wollenw var. *Ciceri*. Erwin (1958) lo renombró *F. lateritium* (Nees) Snyder & Hansen f. sp. *ciceri* (Padw.) Erwin. Siguiendo la clasificación de Snyder y Hansen (1940), Chattopadhyar y Sen Gupta (1967) renombraron al patógeno como *F. oxysporum* Schi. f. sp. *ciceri* (Padw.) Snyder & Hansen, siendo este su nombre correcto; sin embargo en 1971 Booth reconsideró el nombre del agente causal como *F. oxysporum* Schl. f. sp. *ciceri* (Padw.) Matuo & Sato.

2.2.3 Síntomas

La enfermedad presenta dos tipos de síntomas, clorosis y marchitez, que se distinguen por los síntomas morfológicos y severidad. La clorosis se caracteriza por el amarillamiento y necrosis de los folíolos que se desarrollan progresiva y acropetalamente; los folíolos necrosados se desprenden del raquis, originando la muerte de la planta en 45-50 días después de la inoculación. Los síntomas de marchitez se distinguen por la flacidez e hidrosis de los pecíolos y folíolos que adquieren un tono verde-grisáceo que se extiende por toda la planta, seguidos de una desecación rápida; los folíolos, pecíolos y tallo adquieren una coloración castaño claro y se necrosan posteriormente; los folíolos quedan adheridos a la planta después de la muerte de ésta, que ocurre 20 días

después de la inoculación. En ambos casos se observa una coloración marrón en el xilema, medula de la raíz, cuello y tallo. Estos síntomas son inducidos por diferentes razas. Los síntomas de clorosis son provocados por la raza 0 y los síntomas de marchitez son inducidos por las razas 1, 2, 3, 4, 5 y 6. (Haware y Nene, 1982; Cabrera de la Colina, 1985 y 1986 citados por Cabrera de la Colina *et al* 1988; De Miguel, 1991).

2.2.4 Descripción.

El hongo crece en medio de cultivo sólido (papa-dextrosa-agar) a 25 °C y a pH 6, pudiendo tomar una pigmentación blanca, rosa o púrpura. El micelio se caracteriza por ser profusamente ramificado y septado, hialino al principio pero posteriormente se vuelve crema o amarillo y llega a ser rosado en ciertas condiciones. Raramente produce esporodoquios, pero cuando los presentan son cubiertos totalmente por el micelio. Los microconidios son abundantes y producidos en pequeñas monofiálides no ramificadas (microconidióforos), que son falsas cabezas puntiagudas y agudas. Son hialinos, de una sola célula, ovales o cilíndricos, rectos o ligeramente curvos de 2.5-3.5 x 5-11 μ . Los macroconidios son dispersos y producidos en macroconidióforos ramificados, hialinos, tienen paredes delgadas, células terminales en forma de punta, el ápice en forma de gancho y la célula basal en forma de pie, son curvos con 3-5 septas y de 3.5-4.5 x 25-65 μ . Las clamidosporas, son producidas individualmente o en pares intercaladas a lo largo de la hifa, globosas o

subglobosas, con paredes gruesas y superficie lisa, típicamente hinchadas y con frecuencia se puede observar la hifa en los extremos de la clamidospora. En semillas de garbanzo incubadas el hongo produce micelio blanco o ligeramente anaranjado y esporodoquios (Bhushan and Chand, 1992; Ahined and Reddy, 1993; Haware, 1998).

2.2.5 Variabilidad.

El género *Fusarium* incluye aislamientos completamente saprófitos, saprófitos facultativos y patógenos activos, que colonizan al hospedero en algún momento de su ciclo de vida. En general, cada estado se relaciona con las condiciones ambientales así como la sensibilidad del hospedero y su estado fisiológico (Gordon, 1997).

La variabilidad en características morfológicas, fisiológicas y de virulencia del género *Fusarium* ha provocado problemas en su identificación por esto se han desarrollado técnicas y métodos para el estudio de este género.

2.3 Técnicas de caracterización e identificación de la variabilidad de aislamientos

Por la importancia de la enfermedad y distribución es necesario una caracterización precisa, rápida y de bajo costo; precisa, para conocer el agente responsable y aplicar la metodología fitosanitaria adecuada, ya que los

aislamientos patogénicos y no patogénicos no se distinguen morfológicamente; rápida porque la marchitez puede producirse a partir de semillas infestadas lo que podría provocar la diseminación de la enfermedad a áreas sin el patógeno.

Mirete (1999) menciona que cepas de *Fusarium* y otros hongos se clasifican según la función de un determinado gen (razas) o la sintomatología y preferencia por un hospedero específico (forma especial). Otras metodologías empleadas son el estudio de micotoxinas y la capacidad de producir metabolitos secundarios, sin embargo estos métodos no se recomiendan porque son influenciados por las condiciones ambientales bajo las cuales se realizan y además son laboriosos y requieren de más tiempo.

2.3.1 Plantas diferenciales

Se les llama plantas diferenciales por la reacción específica que presentan para determinado hongo, especie o raza del mismo y son establecidos mundialmente. Una raza fisiológica o patotipo se basa en el principio de la existencia de la variabilidad entre los organismos y se define como grupo de individuos morfológicamente idénticos pero se caracterizan por atacar en diferente grado de virulencia a individuos de la misma especie (Robinson, 1989; Maclean *et al.*, 1993; Agrios, 1996; Pérez, 1997).

En el caso de *F. oxysporum* f sp. *ciceri* se encuentran establecidos los siguientes cultivares para la identificación de razas fisiológicas: para la raza

1,2,3 y 4, las diferenciales son JG-62, C-104, JG-74, CPS-1, BG-212, WR-135, L-550, K-850, Annigeri, Chaffa; para las razas 0, 5 y 6 los cultivares son JG-62, C-104, JG-74, CPS-1, BG-212, WR-135 y las líneas 12-071/10054, ICCV-2, ICCV-4, PV-24 Y P-2245 (Haware y Nene, 1982; Trapero y Jiménez, 1985; Phillips, 1988; Jiménez, 1994).

Con base en a su reacción con plantas diferenciales de garbanzo se identificaron las razas 1, 2, 3 y 4 en la India por Haware y Nene (1982), las razas 0 y 5 en España por Jiménez *et al.*, (1989-1990) y la raza 6 en California por Phillips (1988).

2.3.2 Grupos de compatibilidad vegetativa

La agrupación por compatibilidad vegetativa permite subdividir a las poblaciones en grupos genéticamente aislados. La compatibilidad vegetativa se lleva a cabo por el intercambio de información genética entre miembros de un mismo grupo por vía de la heterocariosis en el ciclo parasexual (Meyer, 1991 citado por Vicente *et al.*, 1994; Leslie, 1993). La heterocariosis es el resultado de la complementación entre los diferentes núcleos presentes en algunos organismos, los cuales se forman dentro de un citoplasma con dos núcleos funcionales provenientes de las células parentales; los heterocariontes se originan por la fusión hifal (anastomosis) entre aislamientos auxotróficos relacionados (Puhalla, 1984, 1985; correl *et al.*, 1986; Baayen, 1988; Dornell *et al.*, 1988 citados por Posada y Orozco, 1994) Los genes VIC o HET gobiernan

la incompatibilidad vegetativa para formar heterocariontes (Meyer 1991 citado por Vicente *et al.*, 1994; Leslie, 1993).

En muchos hongos la compatibilidad vegetativa es medida por múltiples loci de incompatibilidad vegetativa. La compatibilidad es homogénea en la mayoría de los casos, por lo que dos aislamientos son compatibles vegetativamente, solo si los alelos de cada uno de los loci VIC correspondientes son idénticos. En hongos con reproducción asexual, las razas compatibles vegetativamente son más similares genéticamente que las incompatibles (Correl *et al.*, 1987 citado por Vicente *et al.*, 1994).

2.3.3 Marcadores genéticos

La diversidad genética en los organismos se ha estudiado desde hace muchos años, la utilización de las diferencias fenotípicas se remontan a las primeras décadas de la genética y fueron aplicadas en el análisis genético del mejoramiento vegetal. Se requiere del uso de caracteres o marcadores genéticos que sean fáciles de identificar y seguir en la descendencia (Valverde y Paredes, 1996; Pérez, 1997).

Existen varias definiciones de marcadores genéticos, Rieger *et al.* (1982, citado por Pérez, 1997) los definen como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético. Gale (1994, citado

por Pérez, 1997) los define como cualquier medio para identificar cualquier locus específico en un cromosoma.

2.3.4 Marcadores morfológicos

Mendoza y Simpson (1996) mencionan que dentro de los organismos vivos existen marcadores morfológicos que son fácilmente detectables como variedad de formas, colores, tamaños, que los distinguen entre sí. Esta variabilidad o polimorfismo genético ocurre en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre dos individuos sirve como una etiqueta o marcador genético que se convierte en un rasgo característico y propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos.

Valverde y Paredes (1996) opinan que la mayoría de estos marcadores son afectados por condiciones ambientales que pueden enmascarar el efecto del gen o genes de interés y generalmente no se pueden observar todos los genotipos, ya que presentan codominancia.

2.3.5 Marcadores moleculares

Otros marcadores utilizados son los marcadores moleculares, estos se basan en el análisis de metabolitos secundarios, proteínas estructurales o enzimas y marcadores de ADN (Mendoza y Simpson, 1996; Valverde y Paredes, 1996; González y Simpson, 1997); éstos presentan ventajas con

respecto a los marcadores morfológicos, ya que son detectados en cualquier tejido y en cualquier etapa de desarrollo, pueden emplearse en cualquier microorganismo, están distribuidos en el genoma y pueden existir numerosos alelos para un mismo marcador y se detecta un alto grado de polimorfismo con la mayoría de las técnicas utilizadas para su detección (Valverde y Paredes, 1996; González y Simpson, 1997).

Flores *et al.*, (1997) reportan que los marcadores moleculares han sido utilizados en estudios de taxonomía, migración y filogenia de fitopatógenos, porque permiten estudios de origen y evolución de razas en poblaciones, facilitando la identificación de genes de interés y construcción de mapas genéticos, además son precisos y la mayoría tienen efectos codominantes.

2.3.5.1 Marcadores proteínicos.

González y Simpson (1997) mencionan que para la obtención de marcadores moleculares basados en proteínas polimórficas, la técnica frecuentemente utilizada es la separación electroforética de proteínas, seguida por la tinción específica de las subclases de proteínas.

Valverde y Paredes (1996) citan que las isoenzimas presentan ciertas ventajas sobre los marcadores morfológicos y que la metodología para su estudio es sencilla. La expresión alélica es usualmente codominante y libre de efectos epistáticos o ambientales; la especificidad enzimática permite identificar

alelos y comparar entre diferentes poblaciones o especies. Sin embargo esta metodología presenta algunas desventajas, ya que requieren diferentes reactivos de extracción y tinción para cada sistema enzimático, son tejido específicos y el número de marcadores que se obtienen generalmente es insuficiente por presentar poco polimorfismo (Flores *et al.*, 1997; Valverde y Paredes, 1996).

Otra de las desventajas es que estos estudios están restringidos a las secuencias de ADN que codifican enzimas detectables y que existen pocas enzimas utilizadas en la mayoría de los hongos (González y Simpson, 1997).

Rodríguez (1999) menciona que en hongos es frecuente el uso de estos marcadores para el análisis de la variabilidad genética, y en estudios de diversidad en especies de *Peronosclerospora* (Micales *et al.*, 1988), *Puccinia* y *Colletotrichum* (Bonde *et al.*, 1994), *Tilletia indica* (Bonde *et al.*, 1989), *Erysiphe graminis* (Koch y Kochle, 1990), *Colletotrichum gloeosporioides*, *Stylosanthus guariensis* (Lenne y Burdon, 1990).

Suseelendra De Sai *et al.*, (1992, citado por Perales, 2000), lograron establecer diferencias entre las razas 1, 2, 3, 4 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, con patrones electroforéticos de proteínas en base a sus valores de factor de corrimiento (Rf).

2.3.5.2 Marcadores basados en ADN.

Con la nueva generación de marcadores basados en la variación del ADN estas limitantes han sido superadas ya que no son afectados por el ambiente; permitiendo analizar directamente el genotipo del individuo y poblaciones de organismos. Por lo que no es necesario la expresión de las secuencias polimórficas, ni que los organismos estén sujetos a condiciones extremas y variadas. Los marcadores de ADN permiten elegir la región de ADN a estudiar y es posible detectar un número ilimitado de polimorfismos (Mendoza y Simpson, 1996; Valverde y Paredes, 1996; González y Simpson, 1997).

Las técnicas para la detección de marcadores moleculares más utilizadas son: polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, por sus siglas en inglés) y polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) las cuales tienen sus bases en la hibridación molecular y la PCR. En estudios de variabilidad genética en hongos los marcadores genéticos utilizados son los RAPD y los AFLP (Mendoza y Simpson, 1996; Valverde y Paredes, 1996; González y Simpson, 1997).

De acuerdo con Mendoza y Simpson (1996), en la detección de polimorfismos con marcadores moleculares se han utilizado dos técnicas

básicas de la biología molecular: La hibridación tipo “southern” y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.3.5.2.1 Hibridación de ácidos nucleicos.

Método utilizado para detectar homología entre secuencias de bases de diferentes moléculas de ácidos nucleicos. Existen diferentes procedimientos de este método que han permitido ser aplicados en el diagnóstico de enfermedades causadas por fitopatógenos, detección de genes específicos y polimorficos. Las cadenas sencillas de ADN son marcadas (radiactiva o no radiactivamente) y se usan como sondas que permiten identificar secuencias homólogas en cadenas sencillas de una muestra determinada de ADN, formando cadenas dobles de ADN, las cuales son observados mediante radiografía o métodos colorígenos, dependiendo del tipo de marcaje de la sonda. Esta metodología ha permitido desarrollar técnicas como los RFLP la hibridación multilocus como los microsatélites y minisatélites (Miller y Martín, 1988; Valadez y Kahl, 2000).

Los RFLP determinan diferencias en sitios específicos del ADN y para su observación es necesario la purificación del mismo y su digestión con enzimas de restricción. Estas enzimas reconocen y cortan el ADN en sitios específicos, de cuatro a seis pares de bases (sitios de restricción). Estos sitios de restricción se encuentran a intervalos variables, por lo que se obtienen fragmentos de diferentes longitudes los que son separados por electroforesis en un gel de

agarosa. Sin embargo, es difícil observarlos en un gel teñido con bromuro de etidio, ya que en la digestión se producen millones de fragmentos discretos; para poder identificar estos fragmentos se transfieren a un soporte sólido (filtro o membrana) y se hibridan con una sonda marcada con P^{32} , digoxigenina o fragmentos de ADN homólogos a uno o varios fragmentos producidos en la digestión. Los fragmentos pueden ser visualizados por autorradiografía. Los RFLP han permitido detectar el grado de polimorfismo entre especies de plantas cultivadas, ya que es posible distinguir genotipos y caracterizar poblaciones. Esto puede ser útil para separar genéticamente grupos de hongos, caracterizar aislamientos, conocer la variabilidad genética en poblaciones, estudios epidemiológicos, obtención de mapas genéticos y determinar el flujo de genes en poblaciones geográficamente separadas (Valverde y Paredes, 1996; Flores *et al.*, 1997; Valadez y Kahl, 2000).

Rodríguez (1999), reporta que esta técnica ha sido utilizado en varios trabajos en el género *Fusarium*, para la caracterización de poblaciones en *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (Kim *et al.*, 1992), en la determinación de formas especiales (Kim *et al.*, 1993), en la diferenciación genética (Kim *et al.*, 1993) y en la caracterización de poblaciones (Edel *et al.*, 1995 y 1997) de *F. oxysporum*, entre otros estudios.

2.3.5.2.2. PCR.

La PCR es una técnica que permite la síntesis *in vitro* de regiones específicas de ADN, en este proceso bioquímico las cadenas individuales de ADN son duplicadas, lográndose la obtención exponencial de millones de copias. Los componentes para la amplificación son: ADN molde o blanco, iniciadores (oligonucleótidos) específicos, semiespecíficos o aleatorios que complementan y/o flanquean a una de las hebras del gen o segmento que actúa como molde; mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP's); solución amortiguadora de reacción, enzima ADN polimerasa *Taq* y cloruro de magnesio. La reacción para la síntesis de ADN se efectúa mediante ciclos térmicos secuenciales (temperaturas y tiempos específicos) en un termociclador programable. Cada ciclo consta de tres pasos:

Desnaturalización (92-98°C, 30-90 segundos), permite la separación de las dos hebras de ADN por el rompimiento de los enlaces que las unen.

Alineación (50-60°C, 30-60 segundos); el iniciador identifica secuencias complementarias y se realiza el apareamiento mediante puentes de hidrógeno.

Extensión (70-74°C, 30-90 segundos), la ADN polimerasa *Taq* incorpora los dNTP's libres a partir del extremo 3' de los iniciadores alineados al ADN molde, permitiendo la extensión de la nueva cadena de ADN. Los fragmentos resultantes, así como el ADN original, servirán de molde para los ciclos

subsecuentes que pueden ser de 30 o más obteniéndose 2ⁿ fragmentos. La visualización de estos fragmentos se lleva a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa, el cual se tiñe con bromuro de etidio (Mcpherson *et al.*, 1992; Barrera *et al.*, 1993; Delpech, 1993; Henson, 1993; Maclean *et al.*, 1993; Oliver, 1993; Ward, 1994; Valadez y Kahl, 1997).

El uso de la PCR en la patología de plantas se incrementó rápidamente, así como en otras disciplinas, con la introducción en 1998 de la ADN polimerasa aislada de *Thermus aquaticus* (*Taq*). Esta enzima presenta estabilidad relativa a temperaturas de desnaturalización del ADN y elimina la necesidad de reemplazar la enzima después de cada ciclo de síntesis, reduce los costos y permite la automatización de los ciclos.

Esta técnica a permitido desarrollar nuevos protocolos como los RAPD's, SCAR, Microsatellite Primers-PCR (MP-PCR), Claved Amplified Polimorphic sequences (CAPs), entre otros (Vieyra, 1993).

Los RAPDs que fue la técnica utilizada en el presente trabajo permite la amplificación de fragmentos de ADN, altamente polimórficos. Se basa en la PCR y permite la amplificación exponencial de fragmentos de ADN delimitados por un iniciador de diez bases de longitud y de secuencias arbitrarias con un contenido de 50 a 80% de guanina-citosina (G + C) y sin presencia de repetidos invertidos que hibridan en secuencias complementarias distribuidas al azar en el ADN blanco de la reacción, en lugar de hibridar en sitios específicos del

genoma. De esta forma se detectan variaciones producidas por mutaciones en los puntos de hibridación o por inserciones o deleciones entre dichos puntos. Entre las ventajas que ofrece esta técnica es que no se necesita información de las secuencias específicas, no requiere de grandes cantidades de ADN (0.1-25 ng) y es más rápido y menos costoso. Los productos amplificados se pueden usar en la identificación y detección de patógenos, para estudios epidemiológicos, o de poblaciones, para programas de mejoramiento en la búsqueda de marcadores asociados a la resistencia de fitopatógenos, elaboración de mapas genéticos, estudios de variabilidad genética y para identificar cepas (Cenis y Beitia, 1994; Leon *et al.*, 1998, Alvarado, 2000; Rojas, 2000).

De acuerdo con Rodríguez (1999), se han utilizado los RAPD's en estudios de variación genética en *Alternaria brassicae* (Shama *et al.*, 1995), *Armillaria ostoyac* (Schulze *et al.*, 1997) y *Aspergillus flavus* (Morales, 1997); en la deferenciación de razas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Chakraborty *et al.*, 1999), caracterización de resistencia en *Phytophthora infestans* (Fabritius *et al.*, 1997).

2.3.5.2.3. AFLP.

De acuerdo con Flores *et al.*, (1997), es una técnica que amplifica mediante PCR en forma selectiva, fragmentos de ADN genómico obtenidos con enzimas de restricción. Esta técnica se lleva a cabo mediante tres etapas:

La primera consiste en cortar el ADN con enzimas de restricción y a la parte final de los fragmentos se ligan adaptadores que poseen una secuencia central y una secuencia específica a una enzima. Estos segmentos servirán para que el iniciador se una específicamente y amplifique sólo los fragmentos de restricción. El segundo paso consiste en la amplificación selectiva de tales fragmentos mediante PCR, empleándose iniciadores que tendrán una secuencia central, una secuencia específica a la enzima adaptadora y una extensión selectiva, normalmente de tres nucleótidos. Esto incrementa la especificidad de los fragmentos obtenidos y reduce su número. Un tercer paso consiste en el análisis de los fragmentos amplificados en gel de agarosa o poliacrilamida y visualizado en autorradiografía.

CIMMYT, 1995; Flores *et al.*, 1997; 1997; Money *et al.*, 1996 y Vos *et al.*, 1995 (citados por Rodríguez, 1999), Reportan que entre las ventajas que presenta esta técnica es que puede emplearse ADN de cualquier origen y complejidad, sin la necesidad de conocer previamente la secuencia y sólo emplea una serie de iniciadores genéticos, esta técnica no se sujeta a condiciones de reacción, calidad de ADN, o temperatura en PCR, evitando problemas de reproducibilidad como cuando se emplea iniciadores arbitrarios en PCR.

La técnica de AFLP se ha utilizado en diversos estudios en hongos fitopatógenos (Rodríguez, 1999), en la variación genética de *Cercospora* sp. (Wang *et al.*, 1998), en la caracterización patogénica de *F. graminearum* y

Leptosphaeria maculans (Bai *et al.*, 1999; Pongam *et al.*, 1998) y en la caracterización de poblaciones de *Leptosphaeria maculans* (Pongam *et al.*, 1999).

3 MATERIALES Y METODOS.

La investigación se realizó en los laboratorios de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola y de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.1 Organismo y condiciones de cultivo.

Se utilizaron 75 aislamientos monospóricos de *F. oxysporum* f. sp. ciceri, obtenidos de 25 aislamientos de plantas de garbanzo con síntomas de marchitez. La colecta se realizó en el estado de Guanajuato en las siguientes localidades: Apaseo el Alto (AA), Apaseo el Grande (AG), Celaya (CI), Cortazar (Cz), Irapuato (Ip), Jaral de Progreso (JP), Juventino Rosas (JR), Rincón de Tamayo (RT), Santiago Maravatillo (SM), Villagran (Vg) y Yuriria (Yr).

El hongo fue aislado en medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y se mantuvieron en el mismo medio a temperatura ambiente. Los cultivos monospóricos se obtuvieron de diluciones de conidios que se sembraron en el mismo medio. Se obtuvieron tres cultivos monospóricos por cada aislamiento obtenido.

3.2 Obtención de micelio

Los aislamientos crecieron en matraces de 125 ml conteniendo 100 ml de medio líquido PD (Papa-Dextrosa). El inóculo se obtuvo de micelio marginal a

los cinco días de crecimiento en medio PDA e incubado a temperatura ambiente. Los matraces se incubaron por siete días a temperatura ambiente, en oscuridad y en movimiento continuo (120 rpm).

El micelio se separó filtrando al vacío a través de papel Whatman No 1 en un kitasato.

3.3 Extracción de ADN.

El ADN se extrajo por el método propuesto por Kelly *et al.*, (1994), para lo cual el micelio se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido, se transfirió a un tubo corex de 15 ml y se agregaron 4 ml de solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8; 250 mM EDTA pH 8; proteinasa K (Sigma) 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Triton-X100, 0.5% v/v), se mezcló por inversión y se incubó a 37°C en agitación continua durante 12 h. Después se adicionó 0.15 vol. de NaCl 1.5M, 0.7 vol. de fenol y 0.3 vol. de cloroformo y se mezcló nuevamente por inversión. Se centrifugó por 1 h a 1 500 000 g a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se adicionó 0.05 vol. de RNasa incubándose a 37°C por 10 min. Posteriormente se agregó 1 vol. de cloroformo y se mezcló por inversión por 5 min. Se centrifugó a 1 500 g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante que fue transferido a otro tubo. Se adicionó 0.54 vol de isopropanol y se mezcló por inversión para que se precipite el ADN, posteriormente se separó la pastilla de ADN por centrifugación (1 500 g por 10 min a 4°C), se lavó con etanol al 70%, se eliminó el alcohol y se dejó

secar a temperatura ambiente invirtiendo los tubos. La pastilla se disolvió en un amortiguador TE (Tris-HCl mM pH8; EDTA 0.5 mM) pH 8 y se guardó a 4°C.

3.4 Cuantificación y pureza de ADN.

Para la cuantificación de ADN, se preparó una dilución (1:10) con agua bidestilada. La determinación se hizo en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-VIS Lambda Bio a 260 nm. Para calcular la concentración de ADN de doble cadena ($\mu\text{g ml}^{-1}$), la lectura obtenida se transformó multiplicándolo por un factor de 50 que es una constante para la cuantificación de ADN de doble cadena.

$$\text{ADN} = \frac{50 \mu\text{g} \times A_{260} \times \text{FD} (10)}{1000 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}}$$

donde:

Coeficiente de absorción = $50 \mu\text{g ml}^{-1}$

A_{260} = absorbencia a 260 nanómetros

FD = Factor de dilución 10

La calidad del ADN se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Se utilizó 1mg de ADN + 2 μl de amortiguador de carga 10X (Azul bromofenol 0.1% p/v; Xileno cyanol 0.15 p/v; Glicerol 40%; EDTA 60 mM pH 8). El gel se colocó en la cámara de electroforesis y fue cubierto con amortiguador TAE 1X (Trisma base 40 mM pH 7.8; Acetato de Sodio 20mM; EDTA 2 mM), las

muestras se colocaron en el gel y se corrieron a 70 voltios por aproximadamente 2.5 h. Para visualizar el ADN el gel se tiñó con bromuro de etidio por 15 min y se expuso a luz ultravioleta para la observación respectiva. Se considera que el ADN es de buena calidad si se observa una sola banda bien definida de alto peso molecular.

3.5 Selección de iniciadores

Se evaluaron 20 iniciadores de la serie C de la casa comercial Carl Roth GMBH de diez bases cada uno (Cuadro 1), se seleccionaron aquellos que detectaron un mayor número de bandas.

3.6 Condiciones de amplificación por RAPD.

La mezcla de reacción para la amplificación fue llevada a un volumen de 25 μL la cual contenía: 5.35 μL agua bidestilada; 10 μL desoxirribonucleótidos trifosfatos dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2.5 μL amortiguador 10x; 0.75 μL cloruro de magnesio; 4 μL de ADN ($25 \text{ ng-}\mu\text{L}^{-1}$); 0.4 μL Taq ADN polimerasa y 2 μL de iniciador (ROTH serie C). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer 480 con un programa general para RAPD's que consiste en un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 1 min seguido de 38 ciclos; cada uno de ellos consistió de desnaturalización a 94°C por 30 s; otra de alineación a 35°C por 30 s y otro de extensión a 72°C por 90 min.

Cuadro 1. iniciadores de la casa comercial Carl Roth GMBH evaluados para la selección y utilización en RAPDs.

Iniciador	secuencia (5'.....3')	peso mol. (g mol ⁻¹)
ROTH C01	TTC GAG CCA G	3026.0
ROTH C02	GTG AGG CGT C	3080.0
ROTH C03	GGG GGT CTT T	3086.0
ROTH C04	CCG CAT CTA C	2948.0
ROTH C05	GAT GAC CGC C	3011.0
ROTH C06	GAA CGG ACT C	3028.0
ROTH C07	GTC CCG ACG A	3011.0
ROTH C08	TGG ACC GGT G	3080.0
ROTH C09	CTC ACC GTC C	2924.0
ROTH C10	TGT CTG GGT G	3086.0
ROTH C11	AAA GCT GCG G	3074.0
ROTH C12	TGT CAT CCC C	2939.0
ROTH C13	AAG CCT CGT C	2987.0
ROTH C14	TGC GTC CTT G	3047.0
ROTH C15	GAC GGA TCA G	3074.0
ROTH C16	CAC ACT CCA G	2957.0
ROTH C17	TTC CCC CCA G	2924.0
ROTH C18	TGA GTG GGT G	3134.0
ROTH C19	GTT GCC AGC C	3002.0
ROTH C20	ACT TCG CCA C	2928.0

3.7 Separación de los fragmentos amplificados.

Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. Se utilizaron 12.5 µL de cada reacción los cuales fueron mezclados con 2 µL de amortiguador de carga, se utilizó 2 µL de un marcador de peso molecular de 1kb y se utilizó ADN de garbanzo como grupo comparador. El gel se colocó en la cámara de electroforesis y fue cubierto con amortiguador TAE, las muestras se colocaron en el gel y se corrieron a 70 voltios por aproximadamente 2.5 h. El gel se tiñió con bromuro de etidio por 15

min y se expuso a luz ultravioleta en un transiluminador Upland modelo TS-20 y se documentó con el sistema KodaK Digital Science EDAS 120.

3.8 Análisis estadístico.

Se elaboró una matriz binaria de datos mediante presencia (1) o ausencia (0) de bandas de las imágenes obtenidas. Para la elaboración de los dendrogramas se utilizó el programa de Sistema de Taxonomía Numérica para Análisis Multivariados (NTSYS.pc 2.3 por sus siglas en inglés). La matriz de similitud se calculó utilizando los agrupamientos respectivos se llevaron a cabo con el método UPGMA (Un weighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) con el coeficiente de Jacard.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN.

El método propuesto por Kelly *et al* (1994) fue el utilizado para todos los aislamientos, ya que se obtuvo ADN de buena calidad para la amplificación de RAPDs (Fig.1).

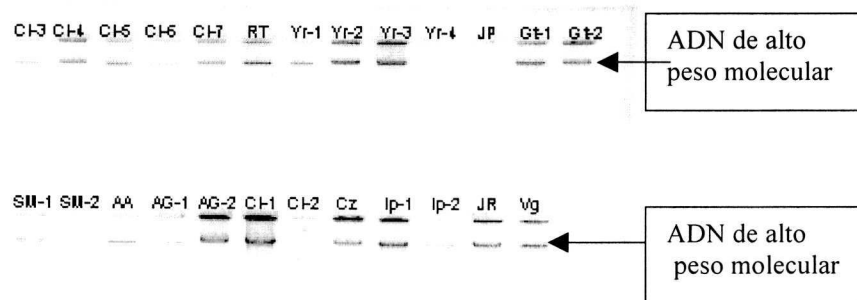


Figura 1. Calidad de ADN obtenido de los aislamientos de *F. oxysporum f. sp. ciceri* colectados en los diferentes municipios. En cada carril se colocó 1 µg de ADN y corresponden a cada uno de los aislamientos colectados.

4.2 Estandarización de la reacción

Las cantidades óptimas de los reactivos para la reacción de PCR fueron seleccionados en función de la presencia de bandas bien definidas observadas después de la amplificación respectiva. Las mejores cantidades se muestran en

el Cuadro 2 que fueron las que se utilizaron para la obtención de huellas genómicas en el hongo en estudio.

Cuadro 2. Cantidades óptimas de reactivos para la amplificación por RAPDs en *F. oxysporum f. sp ciceri*.

Reactivos	Volumen (μ l)
Agua bidestilada	5.35
Desoxirribonucleotidos (200 μ M)	10.0
Amortiguador 10x	2.5
Cloruro de magnesio (50 mM)	0.75
Iniciador (20 pmol)	2.0
ADN polimerasa Taq (5 U μ l ⁻¹)	0,4
ADN nuclear (25 ng μ l ⁻¹)	4.0

4.3 Selección de iniciadores.

De los 20 iniciadores evaluados, se seleccionaron siete de ellos ya que detectaron mayor número de bandas bien definidas y por lo tanto era más probable la detección de polimorfismos. Los iniciadores seleccionados fueron ROTH C05, ROTH C08, ROTH C09, ROTH C14, ROTH C16, ROTH C18 y ROTH C19.

4.4 Separación de los productos amplificados

En las siguientes figuras (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) se ilustran los patrones de bandas de ADN obtenidos con cada uno de los siete iniciadores utilizados así

mismo se indican con una flecha algunos de los polimorfismos detectados, ubicados entre los 5 000 y 500 pb (pares de bases).

En la Figura 2 se puede observar que el iniciador ROTH C05 detectó fragmentos polimórficos, en las cepas CI-6 (A, B y C) con un peso aproximado de 1638 pb; en JP (A, B y C) con una banda de 1500 pb; en SM-2 (A, B y C) dos bandas, una de 1690 y la otra de 1484 pb y en CI-2 (A, B y C) se apreció una banda de 2120 pb aproximadamente.

En la figura 3 el iniciador ROTH C08 detectó también fragmentos polimórficos. En las cepas Yr-4 (A, B y C) se señala una banda polimórfica de 1583 pb; en JP (A, B y C) se aprecia una banda de 1788 pb; en SM-2 (A, B y C) con dos banda de 1227 y 906 pb respectivamente y en CI-2 (A, B y C) tres bandas de 2063, 1517 y 1325 pb aproximadamente.

En la Figura 4 el iniciador ROTH C09 detectó fragmentos polimórficos en las cepas Yr-2 (A, B y C) en donde se puede apreciar una banda de 1221 pb; en JP (A, B y C) una banda de 2299 pb; en SM-2 (A,B y C) dos bandas de 1273 y 1011 pb; y en CI-2 (A, B y C) dos bandas de 1347 y 1120 pb aproximadamente.

En la Figura 5 el iniciador ROTH C14 detectó fragmentos polimórficos, en las cepas JP (A, B y C) con una banda de 1243 pb; en SM-2 (A, B y C) con dos bandas de 3807 y 373; y en CI-2 (A, B y C) con dos bandas 1468 y 500 pb aproximadamente.

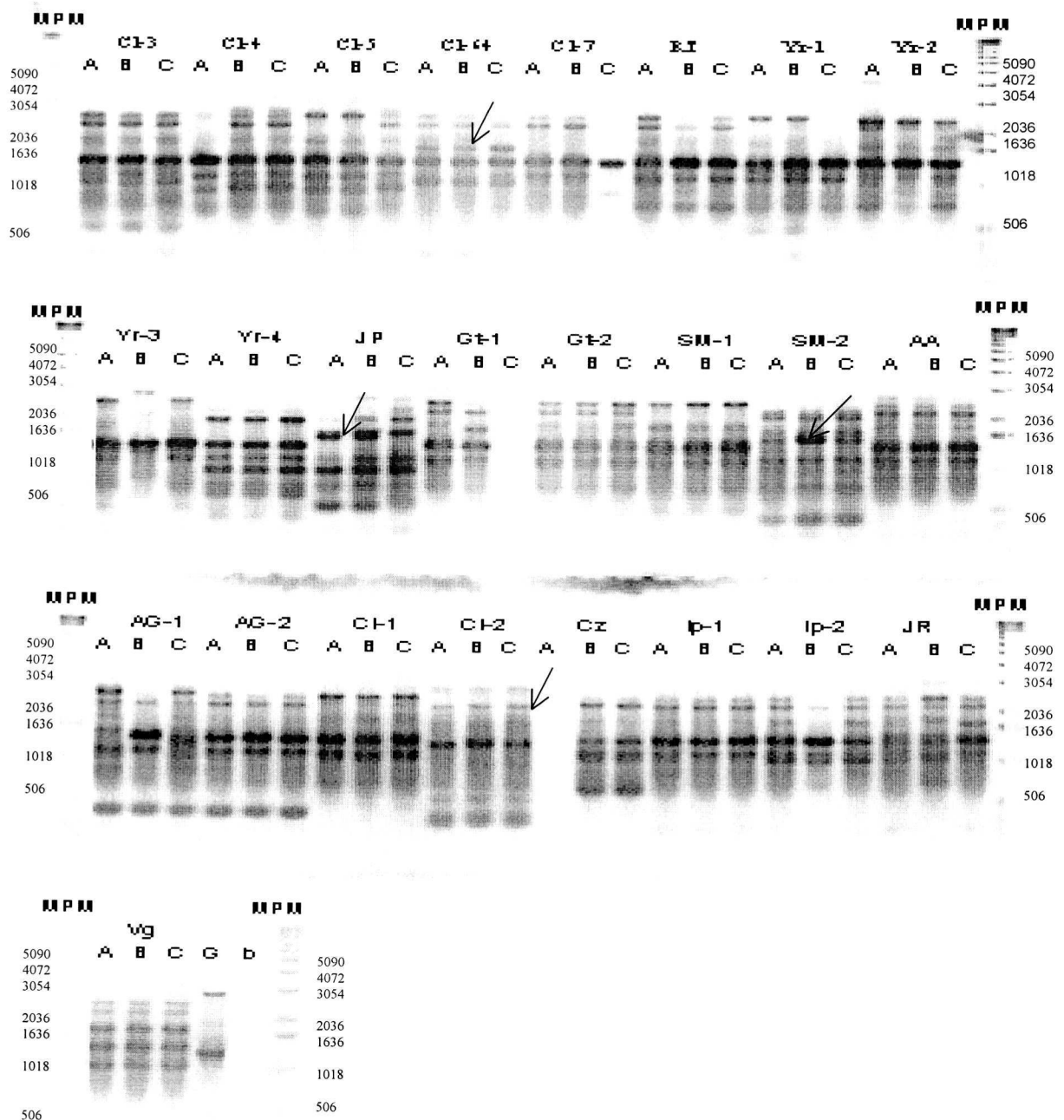


Figura 2. Fragmentos de ADN amplificados por RAPDs de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*; con el iniciador ROTH C05. Las cepas fueron: AA, AG, CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Cz, Gt-1, Gt-2, Ip-1, Ip-2, JP, JR, RT, SM-1, SM-2, Vg, Yr-1, Yr-2, Yr-3, Yr-4 (tres monospóricos por cepa) y G (ADN de garbanzo). Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb de Gibco. Las flechas señalan los polimorfismos detectados.

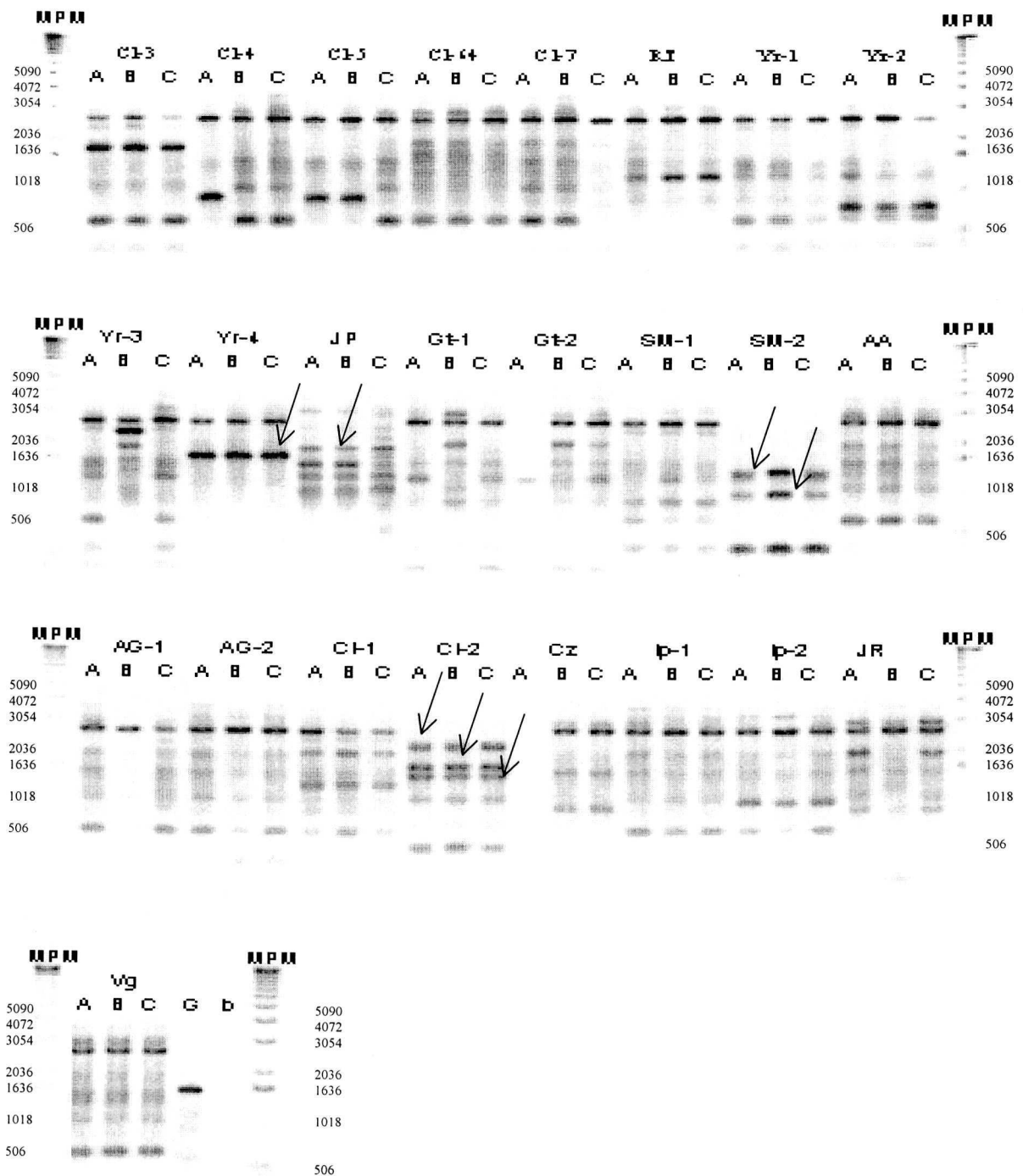


Figura 3. Fragmentos de ADN amplificados por RAPDs de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*; con el iniciador ROTH C08. Las cepas fueron: AA, AG, CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Cz, Gt-1, Gt-2, Ip-1, Ip-2, JP, JR, RT, SM-1, SM-2, Vg, Yr-1, Yr-2, Yr-3, Yr-4 (tres monospóricos por cepa) y G (ADN de garbanzo). Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb de Gibco. Las flechas señalan los polimorfismos detectados.

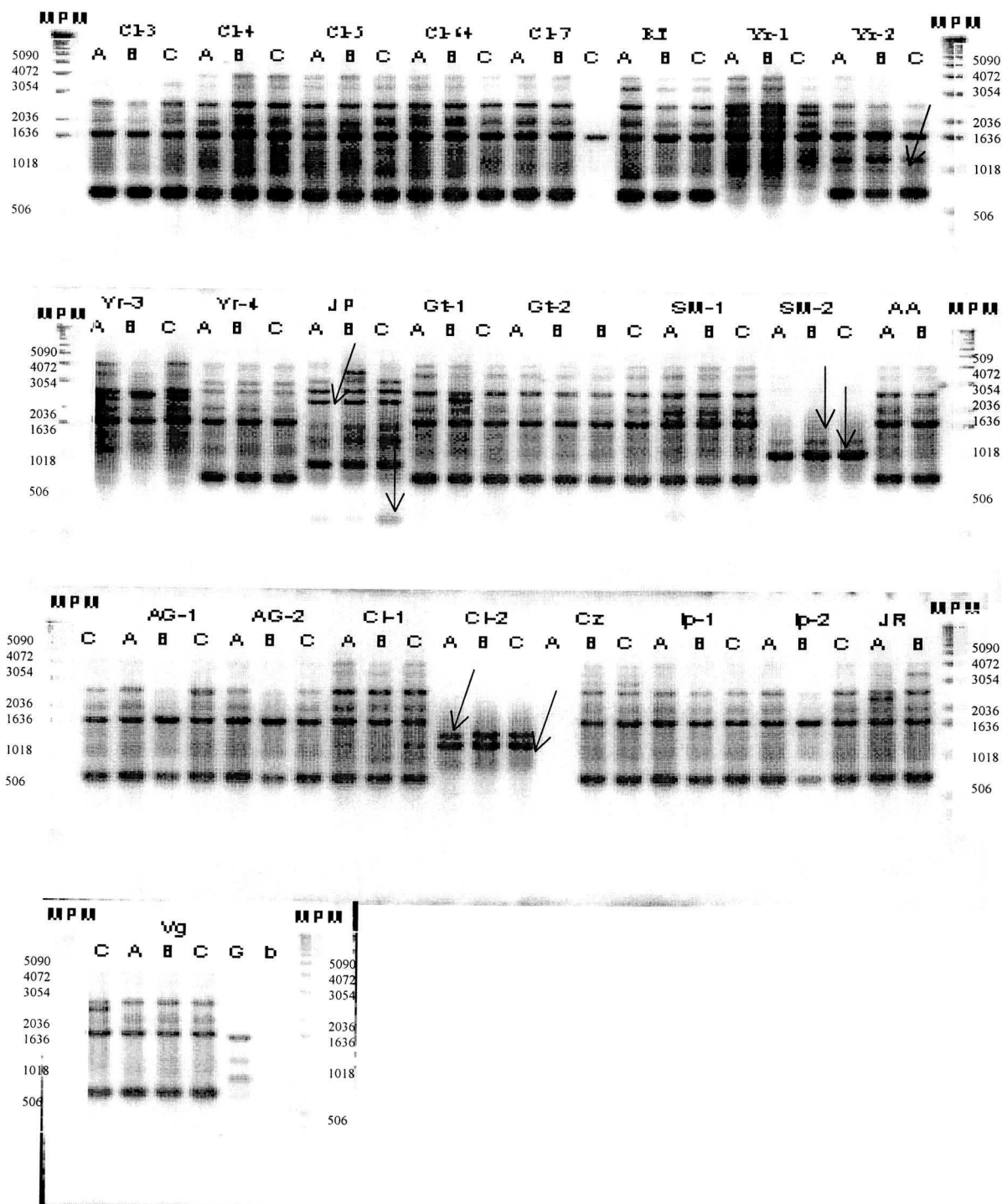


Figura 4. Fragmentos de ADN amplificados por RAPDs de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*; con el iniciador ROTH C09. Las cepas fueron: AA, AG, CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Cz, Gt-1, Gt-2, Ip-1, Ip-2, JP, JR, RT, SM-1, SM-2, Vg, Yr-1, Yr-2, Yr-3, Yr-4 (tres monospóricos por cepa) y G (ADN de garbanzo). Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb de Gibco. Las flechas señalan los polimorfismos detectados.

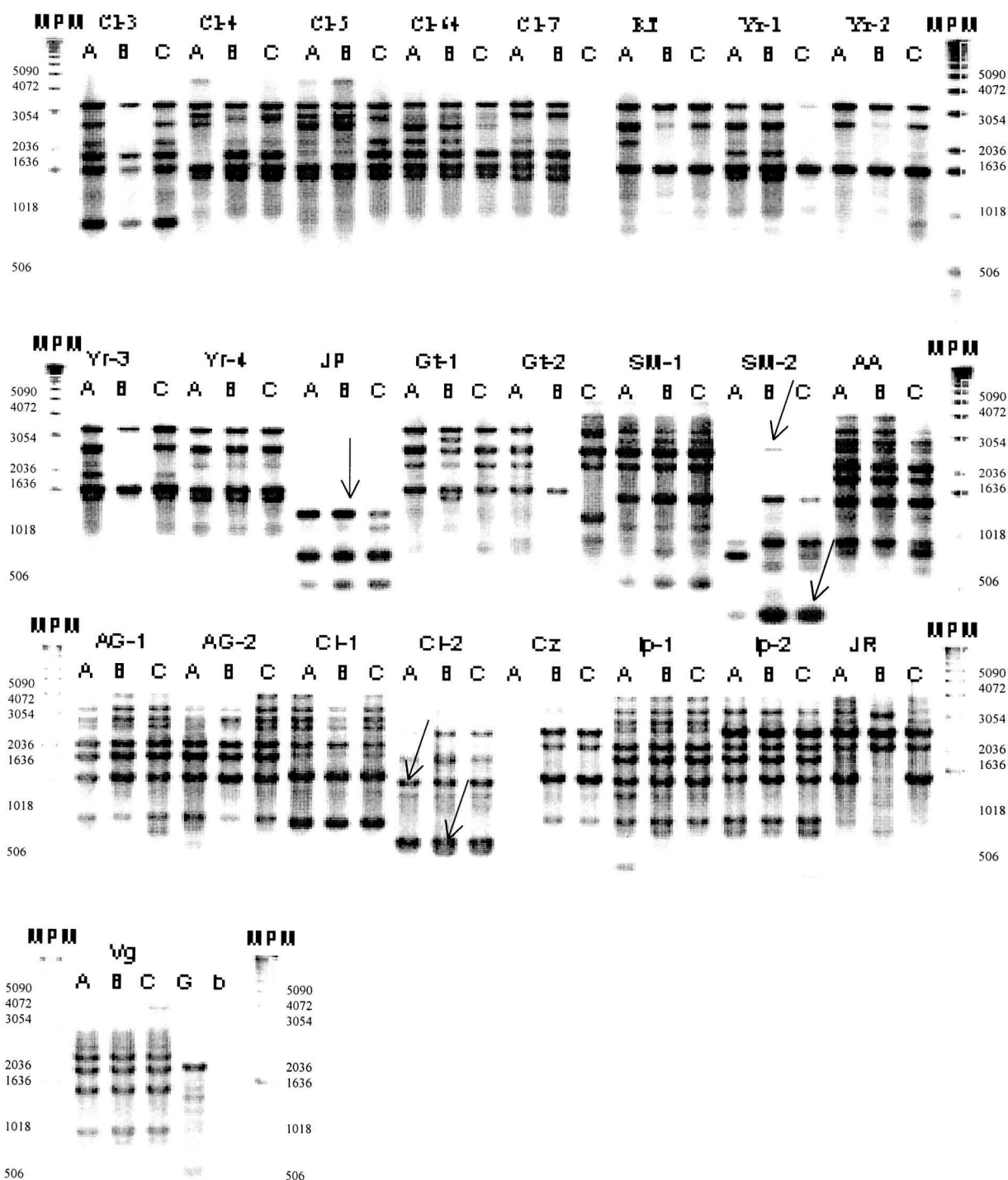


Figura 5. Fragmentos de ADN amplificados por RAPDs de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*; con el iniciador ROTH C14. Las cepas fueron: AA, AG, CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Cz, Gt-1, Gt-2, Ip-1, Ip-2, JP, JR, RT, SM-1, SM-2, Vg, Yr-1, Yr-2, Yr-3, Yr-4 (tres monospóricos por cepa) y G (ADN de garbanzo). Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb de Gibco. Las flechas señalan los polimorfismos detectados.

En la Figura 6 se puede observar que el iniciador ROTH C16 detectó fragmentos polimórficos en las cepas JP (A, B y C) donde se muestran dos bandas de 1780 y 512 pb; en SM-2 (A, B y C) dos bandas de 1745 y 780 pb; en CI-2 (A, B y C) tres bandas de 2884, 1585 y 497 pb aproximadamente.

En la Figura 7 se observa que el iniciador ROTH C18 detectó fragmentos polimórficos en las cepas JP (A, B y C) donde se señalan dos bandas de 1775 y 1096 pb respectivamente, en SM-2 (A, B y C) dos bandas de 1544 y 1016 pb y en CI-2 (A, B y C) dos bandas de 3443, 2161 pb aproximadamente.

En la figura 8 se observa que el iniciador ROTH C19 detectó otros fragmentos polimórficos en las cepas CI-3 (A, B y C) en donde se señala una banda de 2360 pb; en JP (A, B y C) dos bandas 3189 y 518 pb respectivamente; en SM-2 (A, B y C) tres bandas de 2579, 1627 y 537 pb; y en CI-2 (A, B y C) dos bandas de 1419 y 407 pb.

De manera general se observó que las cepas JP, SM-2 y CI-2 (A, B y C) mostraron fragmentos polimórficos con todos los iniciadores considerados. Estos fragmentos detectados responden a que los aislamientos presentan secuencias en su ADN diferentes a las demás y demuestran la variabilidad genética que presenta este organismo y es posible que esta variación pueda conferirle alguna característica distintiva como por ejemplo, virulencia y/o resistencia a alguna condición.

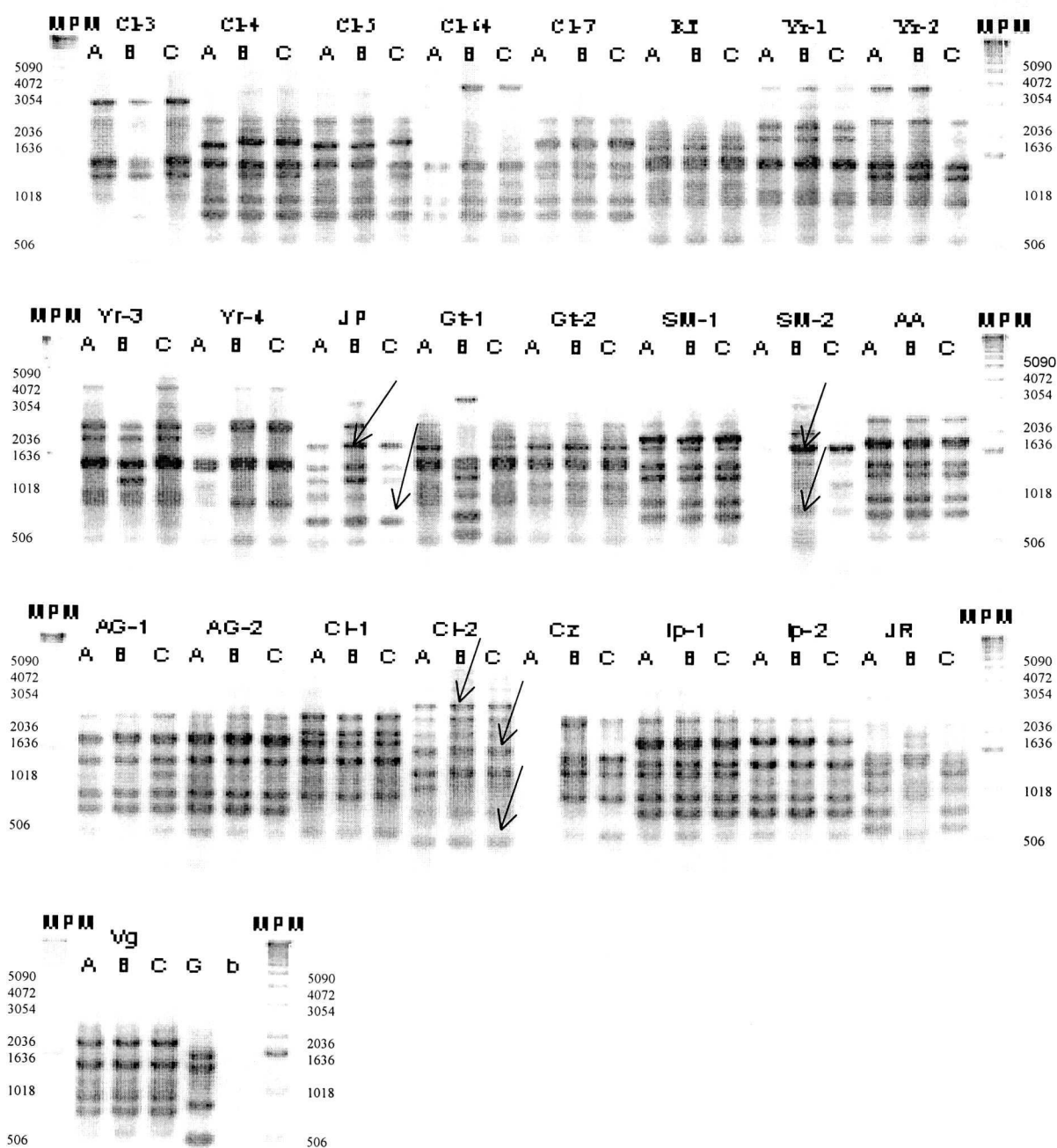


Figura 6. Fragmentos de ADN amplificados por RAPDs de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*; con el iniciador ROTH C16. Las cepas fueron: AA, AG, CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Cz, Gt-1, Gt-2, Ip-1, Ip-2, JP, JR, RT, SM-1, SM-2, Vg, Yr-1, Yr-2, Yr-3, Yr-4 (tres monospóricos por cepa) y G (ADN de garbanzo). Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb de Gibco. Las flechas señalan los polimorfismos detectados.

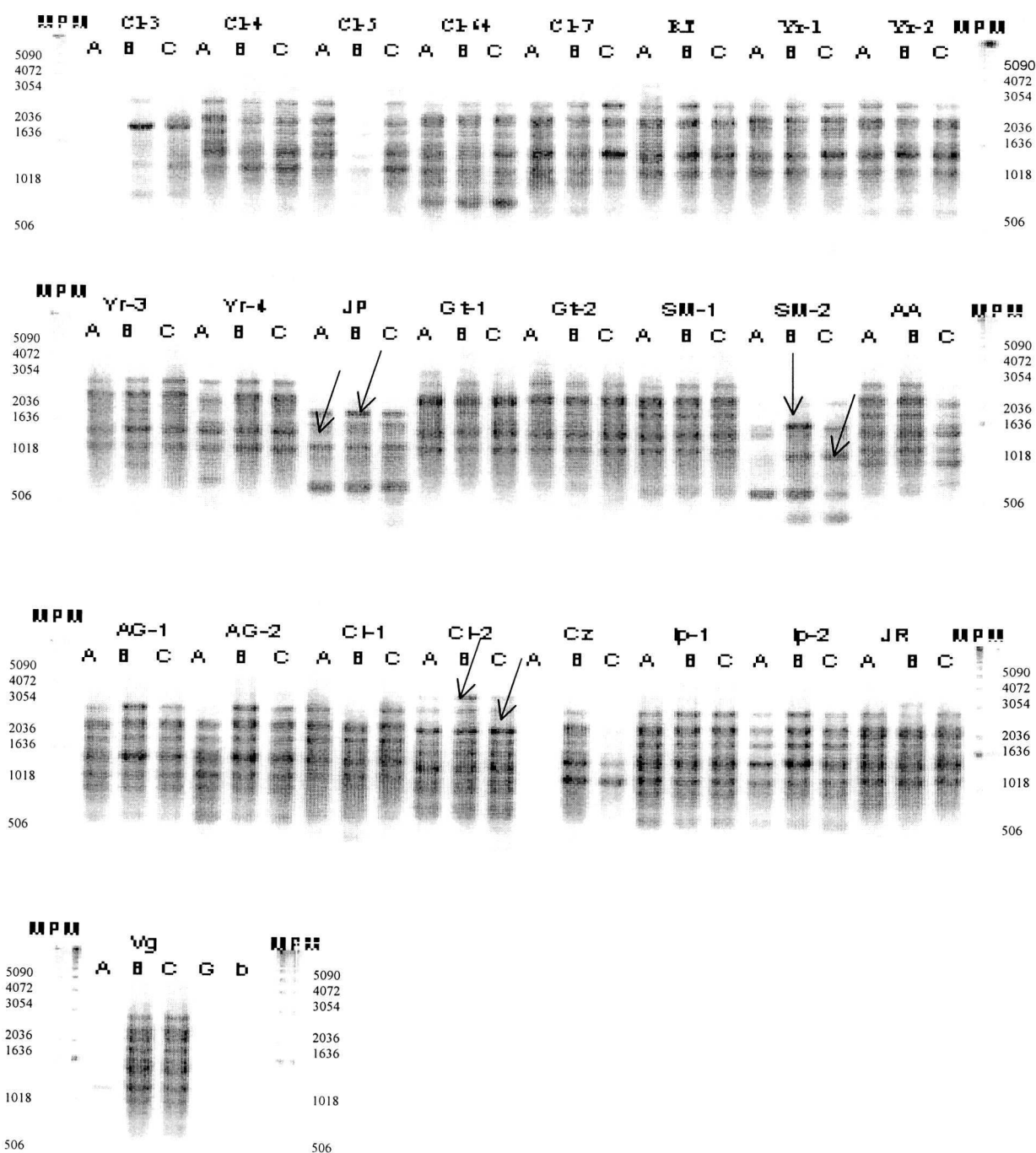


Figura 7. Fragmentos de ADN amplificados por RAPDs de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*; con el iniciador ROTH C18. Las cepas fueron: AA, AG, CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Cz, Gt-1, Gt-2, Ip-1, Ip-2, JP, JR, RT, SM-1, SM-2, Vg, Yr-1, Yr-2, Yr-3, Yr-4 (tres monospóricos por cepa) y G (ADN de garbanzo). Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb de Gibco. Las flechas señalan los polimorfismos detectados.

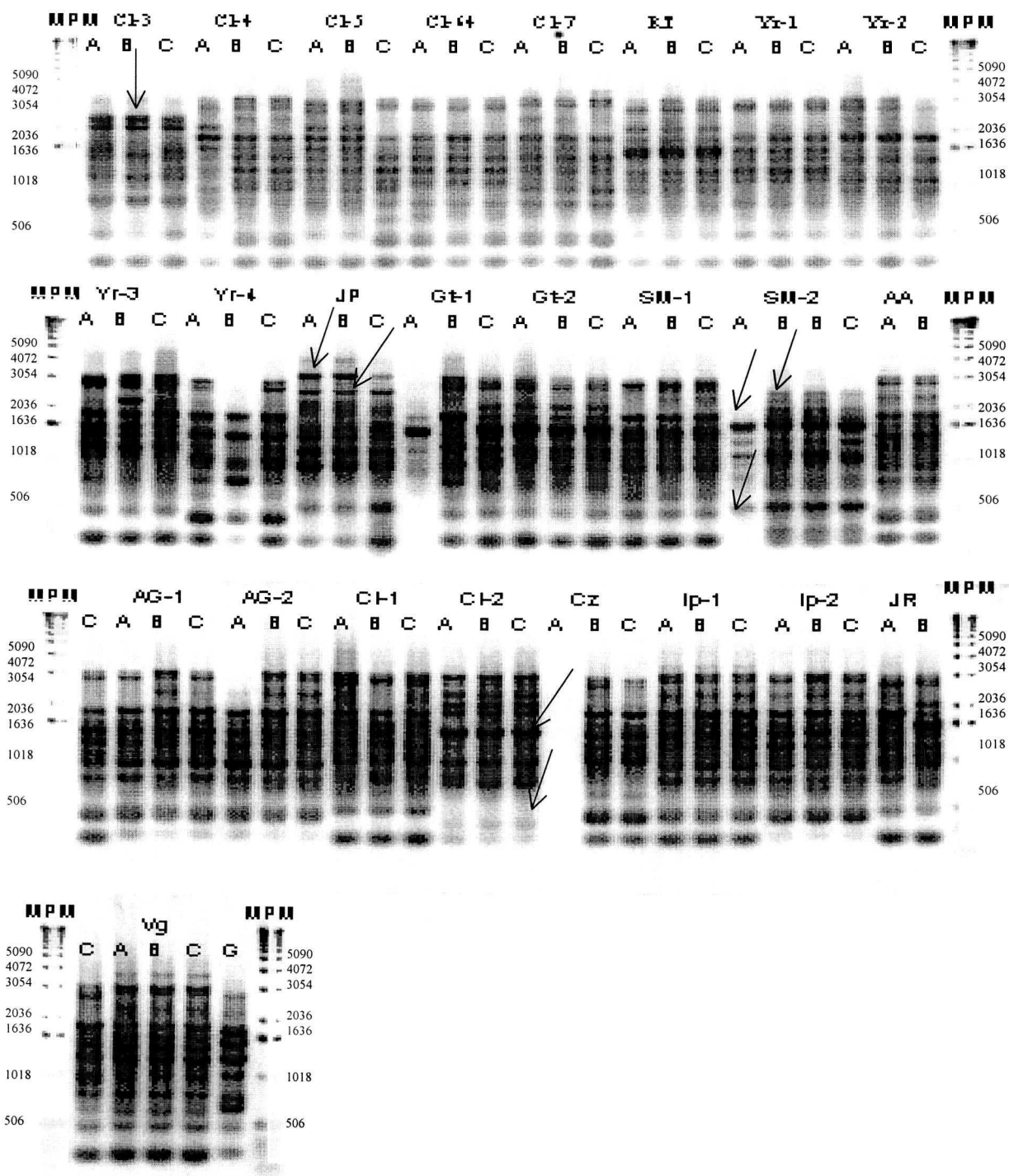


Figura 8. Fragmentos de ADN amplificados por RAPDs de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*; con el iniciador ROTH C19. Las cepas fueron: AA, AG, CI-1, CI-2, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Cz, Gt-1, Gt-2, Ip-1, Ip-2, JP, JR, RT, SM-1, SM-2, Vg, Yr-1, Yr-2, Yr-3, Yr-4 (tres monospóricos por cepa) y G (ADN de garbanzo). Marcador de peso molecular (MPM) de 1kb de Gibco. Las flechas señalan los polimorfismos detectados.

Kelly *et al.*, (1994) al realizar pruebas con RAPDs en *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* obtuvieron polimorfismo con los iniciadores aleatorios KS, P2 y P6 con pesos moleculares entre 0.2 a 4.0 kb; esto les permitió diferenciar genéticamente a los aislamientos que inducen clorosis respecto a los que inducen marchitez.

4.5. Interpretación del dendograma.

La matriz binaria de los datos que se generó con los fragmentos amplificados fue analizado con el programa computacional NTSYS.pc versión 2.3 con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de Jaccard.

En la figura 9 se observa la variabilidad genómica entre los aislamientos colectados en los diferentes municipios de Guanajuato. Con 35 % de similitud se formaron cuatro grupos, en el primer grupo se encuentra los aislamientos CI-1, CI-3, CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, Gt-1, Gt-2, AA, AG-1, AG-2, Ip-1, Ip-2, Cz, JR, Vg, Yr-1, Yr-2 Yr-3, Yr-4, SM, RT; en el segundo grupo se encuentra el aislamiento CI-2; en el tercer grupo el aislamiento JP y en el cuarto grupo el aislamiento SM-2. Con 50 % de similitud se formaron 11 grupos, en el primero se encuentran el aislamiento CL-3; en el segundo CI-4, CI-5, CI-6, CI-7, AA y GT; en el tercero GA, Ip-1, AG, CI-1, Cz y JR; en el cuarto Vg; en el quinto Yr-3, Gt-1, Gt-2 y SM-1; en el sexto Yr-4; en el séptimo RT, Yr-1, y Yr-2; en el octavo CI-7; en el noveno CI-2; en el décimo JP y en el grupo once SM. Con 75 % de

similitud se observan 34 grupos donde se diferencian casi todos los aislamientos.

Los resultados obtenidos permiten deducir que los aislamientos analizados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* presentan una amplia variabilidad genética, a pesar de haberse colectados en regiones muy cercanas geográficamente, para poder definir un menor número de grupos que compartan un mayor número de bandas o características coincidentes, utilizar en primer lugar un mayor número de iniciadores u otras técnicas moleculares más finas, así como realizar evaluaciones en plantas diferenciales y/o pruebas de compatibilidad vegetativa; lo que podría permitir diferenciar razas. Sin embargo esta técnica nos permitió encontrar diferencias a nivel genómico.

Kelly *et al.* (1994) al utilizar la metodología de RAPDs pudo diferenciar aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* que inducen amarillamiento de los que provocan marchitez; así mismo les permitió diferenciarlos de otras especies de *Fusarium*.

Perales (2000) al utilizar la técnica de patrones electroforéticos de proteínas para la identificación de razas *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* con las mismas cepas evaluadas en este trabajo, identificó tres grupos diferentes los cuales pueden corresponder a las razas 1, 3 y 4 (según Suseelndra *et al.*, 1992); sin embargo los resultados obtenidos no son concluyentes en la identificación de razas fisiológicas ya que como reportan Flores *et al.*, 1997; González y

Simpson, 1997; y Valverde y Paredes, 1996; esta técnica presenta desventajas al compararla con la técnica utilizada ya que el número de marcadores que se obtienen son insuficientes por presentar poco polimorfismo. La restricción en la identificación de polimorfismos están restringidos a secuencias de ADN que codifican enzimas detectables y existen pocas enzimas utilizadas en la mayoría de los hongos, además de que la expresión de éstas está influenciada por el medio utilizados en el crecimiento del hongo y el ambiente.

Solís (1999) al inocular las mismas cepas evaluadas en el presente trabajo, en plantas diferenciales, con la finalidad de separar las razas existentes en los municipios muestreados, pudo detectar dos razas la 3 y 4 en base al protocolo propuesto por Haware y Nene (1982) (datos no publicados); sin embargo la gran mayoría de los aislamientos no pudieron ser agrupados en ninguna razas, ya que la respuesta de las plantas diferenciales fue muy heterogénea; esto permite observar por un lado la diversidad genética del hongo por otro, la inconsistencia de la respuesta del hospedante específico; puesto que esto puede estar influenciada por el ambiente.

Por lo anteriormente mencionado podemos decir que la técnica de los RAPDs son una herramienta más fina e importante en la diferenciación genética de aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* respecto a la diferenciación bioquímica y patogénica, ya que permite observar polimorfismos en secuencias de ADN generalmente no relacionadas con la expresión genética.

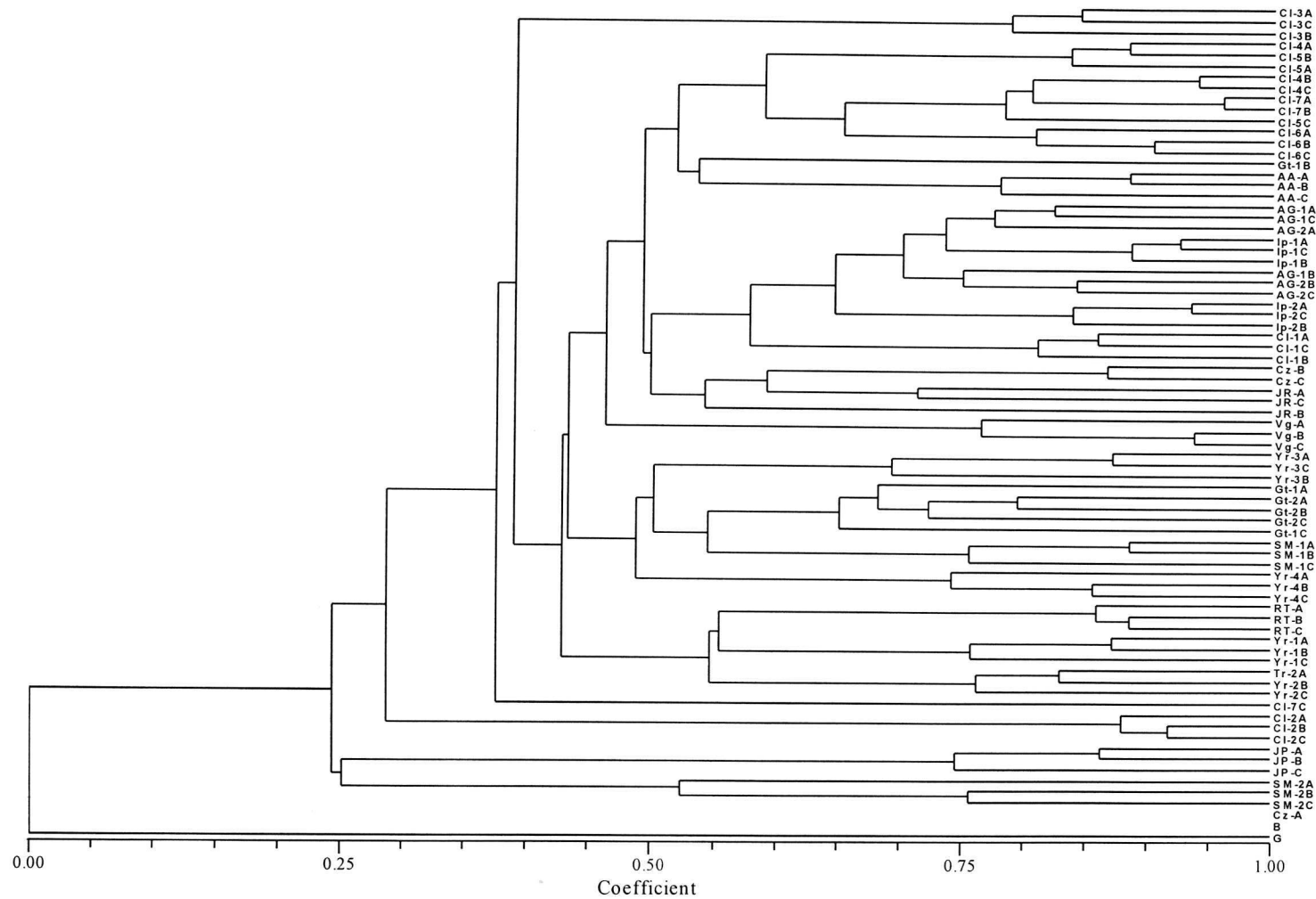


Figura 9. Dendrograma generado del análisis de los fragmentos amplificados por RAPDs de los aislamientos de *F. oxysporum f. sp. ciceri* por el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de Jaccard.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis de similaridad de las bandas amplificadas se observó una variación genética bastante amplia que no permitió definir grupos que indicaran alguna correlación con las razas reportadas, se encontraron distintos agrupamientos con 35 % de similaridad se formaron cuatro grupos, a 50 % de similaridad 11 grupos y a 75 % de similaridad 34 grupos.

Para poder observar con más definición la distinción genética de las razas existentes en México de *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* será necesario coleccionar en otras regiones productoras de garbanzo, obtener un mayor número de aislamientos, utilizar otros iniciadores u otras técnicas moleculares (RFLP, AFLP, etc.); así como realizar evaluaciones de patogenicidad en plantas diferenciales y/o evaluación de grupos de compatibilidad vegetativa.

6 BIBLIOGRAFÍA.

Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. Academia Prees. Inc. San Diego, California, USA. 830 p.

Ahmed, K. M. and C. R. Reddy. 1993. A pictorial guide to the identification of seedborne fungi of sorghum, pearl millet, finger millet, chickpea, pigeonpea and groundnut. ICRISAT. Patancheru, India. 192 p.

Alvarado, C. M. E. 2000. Plimorfismo de ADN amplificado al azar como métodos de diagnóstico. En Memorias: Detección e identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares. México, D.F. pp1-3.

Barrera, S. H A.; Ortiz L; R Rojas M. A y Reséndez P. D, 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo XVIII: 50-60.

Bhushan, L. J. and H. J. Chand. 1992. Chick-pea wilt. In: Plant disease of international: Diseases of cereals pulse. Singh, U. S., Mukhopadhyay, A. N., Kumar, J. and H. S. Chaube. (ed). Prentice Hall, USA. pp. 429-444.

Cabrera de la C. J.; A. Trapero C. And R. M. Jiménez D. 1985. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* in Andalusia, southern Spain. International Chickpea Newsletter 13: 24-26.

Cabrera de la Colina, J; A. Trapero. C; R. M. Jiménez D. 1998. Influencia del ambiente y de la metodología experimental sobre la reacción de cultivares de garbanzo a razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*. Invest. Agr. Prod. Prot. Veg. 3: 393-404.

Cenis, J. L. y F. Beitia. 1994. Aplicación de la técnica RAPD-PCR. (ADN polimorfico amplificado al azar) a la identificación de insectos. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 9:287-297.

De Miguel, G. E. 1991. El garbanzo. Una alternativa para el secano. Ediciones Mudi-prensa. P 132.

Delpch, M. 1993. La aplicación de la PCR. Un nuevo insstrumento para el diagnostico medico. Mundo Científico. 13:174-180.

Díaz, F. A.; González, G. N. y Ortegón, M. A. S. 1996. Rabia del garbanzo: Hongos asociados y su efecto en la producción. Revista Mexicana de Fitopatología. 14(1):51-54.

Fao. 1984. Situación actual de la producción de gramíneas en México. Santiago de Chile, Chile. 64 p.

Flores O. A; J P Martínez S. J. P y Martínez E. A. D. 1997. Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. En: Tópicos selectos en Fitopatología. Genética Molecular. Martínez, S. J. P. Y Martínez, E. A. D. (Eds). Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C. pp. 24-43.

Gómez, G. R. M. Y P. Paredes, V. 1984. El cultivo del garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto Técnico No. 4. SARH-CIAPAN-INIA. 32 p.

Gómez, G. R. M.; M. K. Avilés G.; J. J. Pérez Valdez. y J. R. Manjares S. 1998. El cultivo de garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto para productores No. 41 2ª edición. INIFAP. 32 p.

Gómez, G. R. M.; M. K. Avilés G. y J. J. Pérez Valdez. 1997. Manejo del cultivo de garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto para productores No. 41. INIFAP. 28 p.

González-Chavira, M. M. Y J. Simpson W. 1997. Diversidad genética en hongos (origen y análisis). En: Tópicos selectos en Fitopatología. Genética Molecular.

Gordon, T. R. and R. D. Martyn. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Ann. Rev. Phytopathol 35: 111-128

Govantes, V. F. y A. Montañez J. 1982. El cultivo del garbanzo. Ministro de Agricultura, Pesca y alimentación. Madrid, España. 16 p.

Haware, M. P. 1998. Diseases of chickpea. In The pathology of food and pasture legumes. D. J. Allen and J. M. Lenné. (eds). CAB International. pp 473 – 482.

Haware, P. M. and Nene, Y. L. 1982. Races of *Fusarium oxysporum f sp ciceri*. Plant Disease 66:809-810.

Henson, J. M. And R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Ann. Rev. Phytopathol 31: 81-109.

Jalali, B. L. and Hari Chand. 1992. Chickpea wilt. In Plant disease of international importance. Disease of cereals pulses Vol. I. U. S. Singh, A. N. Mukhopadhyay, J. Kumar, H. S. Chaube. (eds). Prentice Hall, New Jersey, USA. Pp 429 – 444.

Jimenez, D. R. M. 1994. La fusariosis vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*: Quince años de investigación en España. Invest. Agar.:Fuera de serie 2:285 –294.

Kelly, A; A.R. Alcalá-Jiménez; B. W. Bainbridge; J. B. Heale; E. Pérez-Artés and R. M. Jiménez-Díaz. 1994. The use of amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) of genomic DNA for the characterization of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*. In Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification. A. Schots; F. M. Dewey and R. Oliver (Eds). CAB international. pp 75-82

Kelly, A; A.R. Alcalá-Jiménez; B. W. Bainbridge; J. B. Heale; E. Pérez-Artés and R. M. Jiménez-Díaz. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* infecting chickpea. Phytopathology 84:1293-1298.

León O.; M. Díaz; B. Peteira y D. Cintra. 1998. Aplicación de los marcadores moleculares en la caracterización de la variabilidad genética en las colecciones de germoplasma de especies vegetales. Rev. Protección Veg. 13: 69-74.

Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Ann. Rev. Phytopathol 31: 127-150.

Maclean, D. J.; K. S. Braithwaite; J. M. Manners and J. A. G. Irwin. 1993. How do we identify and classify fungal plant pathogens in the era of DNA analysis?. Advances in plant pathology (10) 207-244.

Mateos, H. M. 1996. El cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en México. Tesis profesional Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotécnia, Chapingo, México.

Mcpherson, M.J; Richard J. Oliver and Sarah Jane Gurr. 1992. The polymerase chain reaction. In Molecular plant pathology Volume I A practical approach. Gurr. S. J; M. J. Mcpherson and D. J. Bowles (Eds). IRL PRESS. pp. 123-145.

Mendoza H, A; y Simpson. J. 1997. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. Avances y Perspectivas16: 53-57.

Mirete, C. S. 1999. Análisis mediante la técnica PCR-RFLP de la región espaciadora intergénica (IGS) del rDNA en el género *Fusarium*. Tesis profesional. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. P 92.

Oliver, R. 1993. Nucleic acid-based methods for detection and identification. In Principle of diagnostic techniques in plant pathology. Fox, R. T. V. (ed). CAB International. Pp 153-169.

Perales, R. D. 2000. Identificación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* Schl f. sp. *Ciceri* (padw.) Matuo & Sato, mediante patrones electroforéticos de proteínas. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. P 42.

Phillips, J. C. 1988. A distinct race of Chickpea wilt in california. Inetrnational Chickpea Newsletter 18: 19-21.

Posadas, B. M. L. y Orozco de A. M. 1994. La compatibilidad vegetativa: un método para diferenciar razas fisiológicas y formas especiales de *Fusarium oxysporum* Schlecht. Agronomía Colombiana 11(2): 147-157.

Robinson, R. A. 1989. Manejo del hospedante en patosistemas agrícolas. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. De México. 281 p.

Rodriguez, R. H. 1999. Revisión sobre el uso de marcadores moleculares en hongos fitopatógenos. Tesis Licenciatura. U.A.CH. Chapingo. Mexico. 70 p.

Rojas, M. R. I. 2000. Métodos moleculares para el diagnóstico de hongos fitopatógenos. En Memorias: Detección e identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares. México, D.F. pp1-3.

Valadez, M. E. Y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio. Ed. Mundi prensa. P 182.

Valverde, M. E.; O. Paredes-López. 1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad "el caso de los hongos". Rev. Ciencia y Desarrollo. XXII: 29-37.

Vieyra, L. B. L. 2000. Comparación a nivel de ADN entre frijoles prehispánicos y actuales. Tesis Licenciatura. U.A.CH. Chapingo. Mexico. 75 p.

Ward, E. 1994. Use of the polymerase chain reaction for identifying plant pathogens. In Ecology of plant pathogens. J. P. Blakeman and B. williamson (eds). CAB International. Pp 143-160.

